植 物 分 类 与 资 源 学 报 2014, 36 (4): 514~522
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201413219

昆阳磷矿不同植被恢复模式对土壤理化性质和细菌群落的影响*

李 春[1,4], 李云驹[2], Mortimer Peter E.[1,3], 许建初[1,3**]

(1 中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术重点实验室, 云南 昆明 650201; 2 国家磷资源开发利用工程技术研究中心云南磷化集团有限公司, 云南 昆明 650600; 3 世界农用林业中心东亚分部, 云南 昆明 650201; 4 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 土壤微生物在物质循环过程中具有重要作用且对环境变化敏感, 是衡量土壤质量的重要指标, 在恢复生态学研究中具有重要意义。为探究不同植被恢复模式对土壤理化性质和细菌群落的影响以及土壤细菌群落差异的原因, 本研究以云南省昆阳磷矿为研究对象, 运用 PCR-DGGE 技术和理化指标测定分析了三种植被恢复模式 (芒草丛、旱冬瓜藏柏麻栎混交林、藏柏旱冬瓜混交林) 下土壤细菌群落多样性、物种组成及土壤理化性质。结果表明: (1) 植被恢复有助于改善土壤养分, 不同植被恢复模式下土壤理化性质以及细菌群落多样性和物种组成均存在差异。(2) 土壤细菌多样性与植被恢复模式之间具有显著相关性, 但与土壤理化指标均无显著相关性。(3) 土壤细菌群落物种组成与土壤碱解氮含量以及植被恢复模式间具有极显著相关性, 与其他土壤理化指标间无显著相关性。本研究表明磷矿区不同植被恢复模式下土壤理化性质和细菌群落均具有差异, 土壤细菌群落多样性差异的主要原因为植被恢复模式不同, 物种组成差异的主要原因为土壤碱解氮含量不同, 其次为植被恢复模式不同。

关键词: 磷矿; 植被恢复模式; 土壤理化性质; 土壤细菌群落; PCR-DGGE

中图分类号: Q 948 **文献标识码**: A **文章编号**: 2095-0845(2014)04-514-09

Effects of Different Re-vegetation Patterns on Soil Physicochemical Properties and Bacterial Community in Kunyang Phosphate-mine

LI Chun[1,4], LI Yun-Ju[2], MORTIMER Peter E.[1,3], XU Jian-Chu[1,3**]

(1 *Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 2 *The National Development and Utilization of Phosphorus Resource Engineering Technology Research Center*, *Yunnan Phosphate Chemical Group Company*, Kunming 650600, China; 3 *World Agroforestry Center*, *East-Asia Node*, Kunming 650201, China; 4 *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: Soil microorganisms are applied to evaluate soil quality and significant in restoration ecology for their important roles on nutrient cycle and sensitivity to environment changes. To investigate the effects of re-vegetation pattern on soil physicochemical properties and soil bacterial community and the reasons for soil bacterial community discrepancy, the soils of three re-vegetation patterns (grass of *Miscanthus sinensis*, the mixed forest of *Alnus nepalensis*, *Cupressus torulosa* and *Quercus acutissima*, the mixed forest of *Cupressus torulosa* and *Alnus nepalensis*) in Kunyang phosphate-mine, near Kunming, Yunnan province of China were studied. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and soil physicochemical indices were used to analyze soil bacterial communities (diversity and species composition) and soil physicochemical properties. The results indicated that re-vegetation contributed to soil nutrients and soil physicochemical properties were different in these three patterns. As for soil

* 基金项目: 十二五支撑计划项目 (201300B0AB06); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (Y11D061211); 国家自然科学基金国际合作与交流项目 (Y214361211)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: jxu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2013-12-28, 2013-12-18 接受发表

作者简介: 李 春 (1990-) 女, 硕士, 主要从事土壤微生物生态学研究。E-mail: lichun@mail.kib.ac.cn

bacterial community, the diversity and species composition varied in different patterns. Pearson correlation showed that soil bacterial community diversity was correlated with re-vegetation pattern significantly but not with any soil physicochemical properties determined in this research. Soil bacterial species composition was strongly correlated with soil available nitrogen and re-vegetation pattern but no others through Canonical Correspondence Analysis (CCA). It is concluded that both soil physicochemical properties and bacterial community (diversity and species composition) vary in different re-vegetation patterns and the reason for diversity difference is re-vegetation pattern while the affecting factors of soil bacterial community composition are soil available nitrogen and re-vegetation pattern orderly.

Key words: Phosphate-mine; Re-vegetation patterns; Soil physicochemical properties; Soil bacterial communities; PCR-DGGE

磷矿开采为国民经济建设和农业发展做出了重要贡献，但也带来土地破坏、生态功能减弱、环境污染、人体健康威胁等问题。磷矿为云南省的优势矿产，特别是在滇池周围分布着昆阳、海口、安宁、晋宁、江川等磷矿（于召伟等，2008），因此进行生态恢复对保护滇池及其周围环境尤为重要。生态恢复手段包括物理恢复、化学恢复、生物恢复等，其中生物恢复因其成本低、环境影响小、可就地恢复等优点，在矿区恢复中得到广泛应用（吴金平和顾玉成，2005）。昆阳磷矿上世纪 80 年代便开始植被恢复工作，是首批国家级绿色矿山试点单位，为磷矿区植被恢复研究提供了理想研究地点，但目前研究内容主要涉及地上植物多样性（孟广涛等，2011）、植物群落物种配置（李贵祥等，2012）、土壤肥力（和丽萍等，2012）等方面，对地下生态系统中微生物的研究尚未有报道。然而，土壤微生物在物质循环过程中起主要推动作用，是恢复生态系统中的重要组成部分，在衡量土壤恢复效果时常与土壤性质一起作为评价指标（滕应等，2004；王江和张崇邦，2009；Harris，2003），实际上，因其对环境变化敏感在衡量土壤恢复效果时更有价值。那么，土壤微生物群落究竟是对哪些环境因素的变化敏感呢？近年来，很多学者针对该问题展开了研究和讨论（Jangid 等，2010；Bais 等，2004；Kowalchuk 等，2002；Carney 和 Matson，2005；Asensio 等，2013；Lauber 等，2008；Wu 等，2012；Han 等，2007；张平究和潘根兴，2010；Zhao 等，2012），总结他们的观点，影响土壤微生物群落的环境因素主要包括两部分，一部分是土壤环境因素（土壤 pH、含水量、养分、重金属等），另一部分是植被因素（植被类型、物种、多样性、种植时间等），但不同样地条件和实验方法下各因素的影响程度有所差异，因此，为了更加深入地探究该问题，更多实验条件和方法下的相关研究是很有必要的。特别是针对磷矿区废弃地这一特殊环境，对土壤微生物群落变化及其原因的研究对于理解生态恢复过程以及指导恢复具有重要的意义，但至今知之甚少。

变性梯度凝胶电泳（DGGE）技术自 1993 年首次被应用于微生物群落研究以来，在微生物生态学领域得到了广泛应用，它是一种无需进行培养的分子标记方法，其原理为：长度相同但序列不同的 DNA 片段，其在不同变性剂浓度下解链行为不同因而电泳迁移速率不同，特定 DNA 片段在特定变性剂浓度位置停止迁移，形成图谱中可见的条带（Muyzer 等，1993），因此 DGGE 图谱中条带位置不同表示微生物种类不同，该技术从分子水平上为微生物群落分析提供了一种有力的直观的手段。

本研究运用 PCR-DGGE 分子标记技术对昆阳磷矿处于恢复初期的三种常见植被恢复模式 0~15 cm 土层细菌群落多样性及物种组成进行研究，同时测定相应土壤理化指标，以期探究以下科学问题：（1）不同植被恢复模式下土壤理化性质是否具有差异？（2）不同植被恢复模式下土壤细菌群落是否具有差异？（3）若土壤细菌群落具有差异，是植被恢复模式不同引起的还是不同模式土壤理化性质的差异引起的？本研究对未来磷矿区植被恢复工作具有重要的理论价值。

1　材料与方法

1.1　研究区概况

昆阳磷矿属国有大型露天矿山，坐落于云南省昆明市晋宁县昆阳镇，紧邻滇池南岸。本研究区位于昆阳磷矿植被复垦区内，N 24°43′，E 102°34′，海拔 2 118~2 282 m，年平均气温 14.7°，年均降水量 918 mm，降雨

集中于5-10月，区域土壤类型为红壤（李贵祥等，2012）。昆阳磷矿是较早开展植被恢复的磷矿区之一，复垦区内现多为人工林，主要恢复树种有蓝桉（*Eucalyptus globulus*）、直杆桉（*Eucalyptus maideni*）、云南松（*Pinus yunnanensis*）、华山松（*Pinus armandi*）、藏柏（*Cupressus torulosa*）、墨西哥柏（*Cupressus lusitanica*）、旱冬瓜（*Alnus nepalensis*）、圣诞树（*Acacia dealbata*）、麻栎（*Quercus acutissima*）等，另外还种植了一些灌木和草本植物，其中，芒草丛恢复模式中主要的草本植物包括芒（*Miscanthus sinensis*）、野古草（*Arundinella* sp.）、针茅（*Stipa* sp.）等。

1.2 样品采集

本研究所选择的三种植被恢复模式为2005年及以后种植的芒草丛（C）、旱冬瓜藏柏麻栎混交林（H）和藏柏旱冬瓜混交林（B），以开采后尚未进行植被恢复的土地作为阳性对照（CK），以未经开采的原始藏柏黑荆混交林作为阴性对照（N=Natural）。所有样地均位于昆阳磷矿复垦区内，开采前种植类型相同，开采后覆以1 m厚原有表土，因此土壤本底状况可认为相同。样品采集于2011年12月，每种模式及对照内选取三块10 m×10 m样地作为重复（样地概况见表1，其中，对照三个重复样地之间植被组成及盖度差异小，未一一列出），每样地内运用五点采样法选取5个采样点，去除表面腐殖层后分别采集0~15 cm土层的土壤，均匀混合后采用四分法取约0.5 kg土壤作为该样地的土壤样品。去除土壤中杂质后过2 mm分样筛，将土样分为两部分，一部分于-20 ℃保存用于土壤微生物群落分析（本实验中未对对照土样进行微生物群落分析），另一部分风干后进行土壤理化指标测定。

1.3 土壤理化指标测定

本研究中共测定土壤理化指标13项，分为两类，土壤基础理化指标包括pH、有机质、全氮、碱解氮、全磷、速效磷、全钾、速效钾，土壤重金属指标包括总汞、总砷、总铅、总铬、总镉。pH测定采用电位法，有机质采用油浴重铬酸钾容量法，全氮采用半微量开氏法，碱解氮采用碱解扩散法，全磷采用氢氧化钠熔融-钼锑抗比色法，速效磷采用氟化铵浸提-钼锑抗比色法，全钾采用氢氧化钠熔融-火焰分光光度法，速效钾采用乙酸铵浸提-火焰分光光度法。总汞和总砷测定采用原子荧光法，总铅、总铬、总镉的测定采用王水回流消解原子吸收法。

1.4 土壤细菌16S rDNA基因的PCR-DGGE

1.4.1 *土壤基因组总DNA提取* 采用美国Omega Bio-Tek公司的E. Z. N. A.™ Soil DNA Kit试剂盒进行土壤基因组总DNA提取，每份土样做3次重复，每次重复土壤用量为500 mg，提取结果利用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4.2 *细菌16S rDNA V3区特异性片段的PCR扩增*

本研究运用巢式PCR技术（Zhao等，2012；郑贺云等，2012）对土壤细菌16S rDNA V3区片段进行PCR扩增，为提高PCR效果，使用天根生化科技（北京）有限公司生产的2×Taq PCR MasterMix。第一轮所用引物为细菌16S rDNA通用引物F27（5′-3′序列为AGAGTTTGATCCTGGCTCAG）和R1492（5′-3′序列为TACCTTGTTACGACTT）（Jangid等，2008），扩增片段长度约1 500 bp，PCR反应体系（50 μL）包括DNA模板2 μL、引物各1 μL、2×Taq PCR MasterMix 22 μL，PCR反应条件为：94 ℃变性5 min，循环31次，每次循环中94 ℃变性40 s、45 ℃退火40 s、72 ℃延伸60 s，最后72 ℃延伸7 min。第二轮所用引物为细菌16S rDNA V3区通用引物GC-338F（5′-3′序列为CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG）和

表1 样地概况

Table 1 General situations of the sample plots in this research

样地编号 NO.	恢复模式 Re-vegetation pattern	恢复时间 Re-vegetation time	植被组成及盖度 Vegetation composition and coverage
C1	芒草丛	2007	芒、野古草、早熟禾等6种，约95%
C2	芒草丛	2007	芒、大狗尾草、野古草等9种，约95%
C3	芒草丛	2007	芒、针茅、蒿sp. 等6种，约100%
H1	旱冬瓜藏柏麻栎混交林	2006	旱冬瓜25%，藏柏15%，麻栎10%，蒿sp.、紫茎泽兰、白花车轴草等6种约40%
H2	旱冬瓜藏柏麻栎混交林	2006	旱冬瓜20%，藏柏10%，麻栎5%，紫茎泽兰、青茅、野坝子等10种约15%
H3	旱冬瓜藏柏麻栎混交林	2006	旱冬瓜25%，藏柏15%，麻栎10%，戟叶酸模、紫茎泽兰、白花车轴草等13种约45%
B1	藏柏旱冬瓜混交林	2005	藏柏60%，旱冬瓜几乎全部枯死，白花车轴草、蒿sp.、马桑等4种约5%
B2	藏柏旱冬瓜混交林	2005	藏柏50%，旱冬瓜10%（存在枯死现象），白花车轴草、蒿sp.、马桑等4种约5%
B3	藏柏旱冬瓜混交林	2005	藏柏40%，旱冬瓜5%（存在枯死现象），白花车轴草、蒿sp.、鬼针草等3种约70%
CK	尚未进行植被恢复		蒿sp.、紫茎泽兰等2种约10%
N	未经开采		藏柏40%，黑荆20%，牛膝、紫茎泽兰、杜氏鼠尾草等8种约15%

518R（5′-3′序列为ATTACCGCGGCTGCTGG），扩增片段长度约200 bp，PCR反应体系（50 μL）包括DNA模板（直接以第一轮PCR产物为模板）1 μL、引物各1 μL、2×Taq PCR MasterMix 22 μL，PCR反应条件为：94 ℃变性5 min，循环35次，每次循环中94 ℃变性30 s、58 ℃退火30 s、72 ℃延伸30 s，最后72 ℃延伸7 min（Becker等，2006）。引物由生工生物工程（上海）有限公司合成，稀释至10 μmol·L^{-1}后使用，PCR扩增结果利用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4.3　第二轮扩增产物的DGGE（变性梯度凝胶电泳）

对Muyzer的方法（Muyzer等，1993）进行优化，采用Bio-Rad公司的DCode™基因突变检测系统对第二轮PCR产物进行分离，使用8%的聚丙烯酰胺凝胶（丙烯酰胺∶双丙烯酰胺=37.5∶1），变性梯度为40%~55%（100%变性剂指7 mol·L^{-1}尿素与40%的去离子甲酰胺的混合物），由上至下递增。加100 μL过硫酸铵（APS）和20 μL TEMED至胶完全凝固后，将胶板置于装有1×TAE电泳缓冲液的电泳槽中，将同一土样三次重复的第二轮PCR产物等量混合作为该样品的第二轮PCR产物，去除加样孔内气泡后取第二轮PCR产物与溴酚蓝的混合物20 μL（PCR产物∶溴酚蓝=3∶1）加入加样孔，恒温60 ℃，220 V预电泳5 min，之后将电压调至80 V电泳13 h。待电泳结束后，取下凝胶进行银染并拍照，得到DGGE图谱（Zhao等，2012）。

1.5　数据分析

运用图像分析软件Quentity One（4.6.2）对DGGE图谱进行分析，根据数据化结果计算土壤细菌多样性指标：丰富度（S）、Shannon-Wiener多样性指数（H′）及Pielou均匀度指数（J），公式如下：

$$H' = -\sum Pi\ln Pi,\ J = H'/H_{max}$$

其中，Pi为相对多度，用相对亮度代表，$H_{max}=\ln S$，S为条带数目。

根据条带位置列出二元矩阵（存在记为1，不存在记为0），利用IBM SPSS19.0统计软件计算Jaccard系数，相关分析也利用IBM SPSS19.0统计软件进行，典范对应分析（CCA）运用Canoco for windows 4.5软件。

2　结果与分析

2.1　植被恢复对土壤理化性质的影响

三种植被恢复模式及对照土壤（0~15 cm）13项理化指标如表2所示，开采后尚未进行植被恢复的土壤（CK）与原始土壤（N）相比，全钾和速效磷含量高于后者，但pH和其他养分指标均低于后者，重金属指标中，除镉外均高于后者，可见，磷矿开采利于土壤全钾和速效磷含量提高，但会导致土壤pH和其他养分含量降低以及重金属含量升高。按照文献中报道的全国第二次土壤普查养分分级标准（姚荣江等，2009），未恢复土壤及三种模式土壤中磷和钾养分丰富，而有机质和氮养分缺乏，按照土壤环境质量标准（GB 15618-2008），磷矿区土壤中重金属含量对植物基本不造成污染，因此，影响磷矿区废弃地土壤质量的主要因素为有机质和氮养分。由于土壤中磷养分并非限制性因素，而且可能因覆土时不均匀而存在分布不均匀现象，因此本研究在进行土壤理化性质分析时将全磷和速效磷指标排除。

表2　不同植被恢复模式及对照土壤（0~15 cm）理化指标（平均值±标准差）

Table 2　Soil (0-15 cm) physicochemical indices of different re-vegetation patterns and control (mean ± *SE*)

土壤理化指标 Soil physicochemical indices	C	H	B	CK	N6
pH（Water∶Soil=2.5∶1）	6.11±0.22	5.81±0.41	6.05±0.20	6.16±0.22	7.11±0.08
有机质 OM/g·kg^{-1}	13.39±3.28	8.41±2.01	17.27±10.23	14.25±3.88	25.28±10.13
全氮 TN/g·kg^{-1}	0.78±0.12	0.71±0.10	0.93±0.40	0.30±0.03	1.08±0.27
全磷 TP/g·kg^{-1}	17.35±1.46	1.14±0.27	14.68±5.04	8.91±0.22	15.41±2.03
全钾 TK/g·kg^{-1}	18.62±1.92	20.06±1.38	20.63±0.27	27.58±4.46	25.45±1.78
碱解氮 AN/mg·kg^{-1}	34.82±8.26	23.09±2.20	48.75±26.49	18.53±1.54	56.60±19.63
速效磷 AP/mg·kg^{-1}	160.90±6.61	18.66±5.46	102.38±2.78	77.18±15.97	19.45±4.80
速效钾 AK/mg·kg^{-1}	204.41±19.05	174.22±20.95	170.03±43.65	118.61±16.14	217.83±18.15
总汞 Total Hg/mg·kg^{-1}	0.23±0.01	0.10±0.04	0.23±0.02	0.21±0.06	0.13±0.01
总砷 Total As/mg·kg^{-1}	24.47±3.26	27.61±17.30	26.56±1.05	17.54±2.49	17.04±1.63
总铅 Total Pb/mg·kg^{-1}	66.67±7.40	24.04±5.07	99.21±4.67	87.55±12.37	51.27±10.16
总铬 Total Cr/mg·kg^{-1}	83.91±9.86	90.96±15.27	99.05±15.50	95.99±11.07	53.53±10.69
总镉 Total Cd/mg·kg^{-1}	0.25±0.01	0.27±0.02	0.29±0.02	0.18±0.02	0.26±0.03

植被恢复5年后，与原始土壤相比，三种模式土壤pH、有机质、全氮、碱解氮、全钾、速效钾含量均低，砷、铬、铜含量均高，土壤恢复仍是磷矿区生态恢复的一项重大课题。但与尚未进行植被恢复的土壤相比，三种模式土壤全氮、碱解氮、速效钾含量均升高，特别是土壤氮养分，但升高幅度不同。氮养分升高幅度藏柏旱冬瓜混交林>芒草丛>旱冬瓜藏柏麻栎混交林，速效钾升高幅度芒草丛>旱冬瓜藏柏麻栎混交林>藏柏旱冬瓜混交林。速效钾含量升高的同时，三种模式土壤全钾含量均下降，下降幅度芒草丛>旱冬瓜藏柏麻栎混交林>藏柏旱冬瓜混交林，说明植被恢复土壤中速效钾的转化速率提高。物质转化过程中往往需要酸的参与（Rodriguez 和 Fraga，1999），因而植被恢复土壤pH降低，降低幅度旱冬瓜藏柏麻栎混交林>芒草丛>藏柏旱冬瓜混交林。三种模式中，旱冬瓜藏柏麻栎混交林土壤有机质含量明显低于未恢复土壤以及氮养分升高幅度小，主要因为恢复初期植物快速生长导致消耗量大于积累量，藏柏旱冬瓜混交林由于旱冬瓜存在枯死现象增加了土壤有机质和氮养分含量。重金属方面，只有旱冬瓜藏柏麻栎混交林土壤汞和铅含量明显低于未恢复土壤，其他无异于甚至高于未恢复土壤，究其原因主要是未恢复地植被覆盖度低，重金属较易流失，这从侧面说明植被恢复措施能够有效抑制土壤中元素的流失，三种模式土壤总汞、总铅和总铬含量具有较大差别。综上，植被恢复措施在改善土壤养分方面具有重要作用，与未恢复土壤相比，不同植被恢复模式下土壤理化性质的变化不同，植被恢复模式不同引起土壤理化性质的差异。

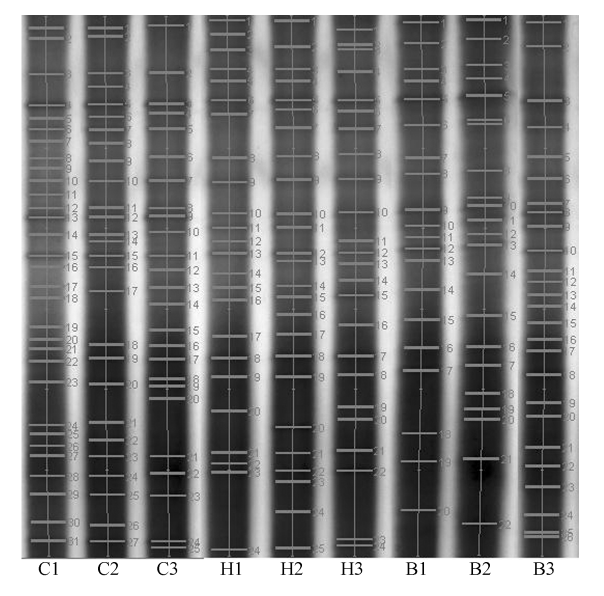


图1 不同植被恢复模式土壤细菌16S rDNA基因的DGGE图谱

Fig. 1 DGGE profile of 16S rDNA genes of soil bacteria for different re-vegetation patterns

2.2 不同植被恢复模式对土壤细菌群落的影响

由图1中各样地条带位置可看出，不同植被恢复模式土壤细菌物种组成具有较大差异，进一步计算Jaccard系数（本文未列出）发现，不同模式间土壤细菌物种组成相似性低于50%，说明不同植被恢复模式下土壤细菌群落物种组成发生了较大变化。土壤细菌多样性指标（表3）表明，不同植被恢复模式下土壤细菌多样性也存在差异，大小关系为芒草丛>旱冬瓜藏柏麻栎混交林>藏柏旱冬瓜混交林。综上，不同植被恢复模式下土壤细菌群落多样性及物种组成均具有差异。

2.3 土壤细菌多样性与植被恢复模式及土壤理化性质的相关性分析

土壤细菌多样性指标与植被恢复模式以及土壤理化指标的Pearson相关性大小（表4）表明，土壤细菌多样性与植被恢复模式具有显著相关性，而与所测所有土壤理化指标间均无显著相关性，由此可知，引起土壤细菌多样性差异的主要原因是植被恢复模式不同而不是土壤理化性质的差异。

表3 不同植被恢复模式土壤细菌丰富度、多样性及均匀度

Table 3 Richness, diversity and evenness of soil bacteria for different re-vegetation patterns

恢复模式 Re-vegetation pattern	S	H'	J
C	27.7 ± 3.1	2.82 ± 0.07	0.85 ± 0.03
H	24.3 ± 0.6	2.66 ± 0.11	0.83 ± 0.03
B	22.7 ± 3.1	2.55 ± 0.22	0.82 ± 0.04

S：丰富度；H′：Shannon-Wiener多样性指数；J：Pielou均匀度指数；C：芒草丛；H：旱冬瓜藏柏麻栎混交林；B：藏柏旱冬瓜混交林

S: Richness; H′: Shannon-Wiener diversity index; J: Pielou evenness index; C: grass of *Miscanthus sinensis*; H: the mixed forest of *Alnus nepalensis*, *Cupressus torulosa* and *Quercus acutissima*; B: the mixed forest of *Cupressus torulosa* and *Alnus nepalensis*

表4　土壤细菌多样性指标与植被恢复模式以及土壤理化指标的 Pearson 相关性

Table 4　Pearson correlations between the indices of soil bacterial diversity, re-vegetation pattern and physicochemical properties

	S	*H′*	*J*
Re-vegetation pattern	−0.698*	−0.679*	−0.464
pH	0.177	−0.035	−0.191
OM	−0.164	−0.357	−0.41
TN	−0.192	−0.382	−0.431
TP	0.22	0.177	0.109
TK	−0.17	−0.457	−0.586
AN	−0.206	−0.355	−0.37
AP	0.388	0.344	0.225
AK	0.401	0.309	0.148
Total Hg	0.028	−0.059	−0.104
Total As	−0.091	−0.312	−0.437
Total Pb	−0.138	−0.184	−0.155
Total Cr	−0.057	−0.285	−0.415
Total Cd	−0.357	−0.412	−0.35

* 具有显著相关性（$P<0.05$）

* means significant correlation（$P<0.05$）

2.4　土壤细菌物种组成与植被恢复模式及土壤理化性质的关系

对各样地土壤细菌物种组成与环境因子（植被恢复模式、样地因素、土壤理化指标）进行典范对应分析（CCA），排序结果如图2所示，箭头表示环境因子，箭头所处象限表示环境因子与排序轴之间的正负相关性，箭头连线与排序轴的夹角大小表示该环境因子与排序轴的相关性大小，夹角越小相关性越大，箭头连线的长度代表某个环境因子与土壤细菌分布的相关性大小，长度越长相关性越大（林先贵，2010）。由图2可知，第一和第二排序轴共能解释土壤细菌物种分布45.6%的差异，植被恢复模式、样地因素以及土壤养分含量对土壤细菌物种组成的影响较大，土壤pH和重金属含量的影响较小。进行显著性检验（表5）表明，土壤细菌群落物种组成与土壤碱解氮含量以及植被恢复模式之间具有极显著相关性，与其他环境因子之间无显著相关性，对磷矿区土壤细菌群落物种组成影响最大的环境因子为土壤碱解氮，其次为植被恢复模式。

表5　环境因子对土壤细菌群落物种组成影响的显著性检验

Table 5　Significance testing on the effects of environment factors on soil bacterial species composition

环境因子	LambdaA	*P*	*F*
碱解氮 AN	0.55	0.001	2.04
植被恢复模式 Re-vegetation pattern	0.48	0.002	2.08
总铅 Total Pb	0.29	0.281	1.3
总砷 Total As	0.28	0.324	1.36
总镉 Total Cd	0.23	0.394	1.18
全磷 TP	0.22	0.392	1.21
速效磷 AP	0.23	0.37	1.62
样地 Site	0.14	1	0

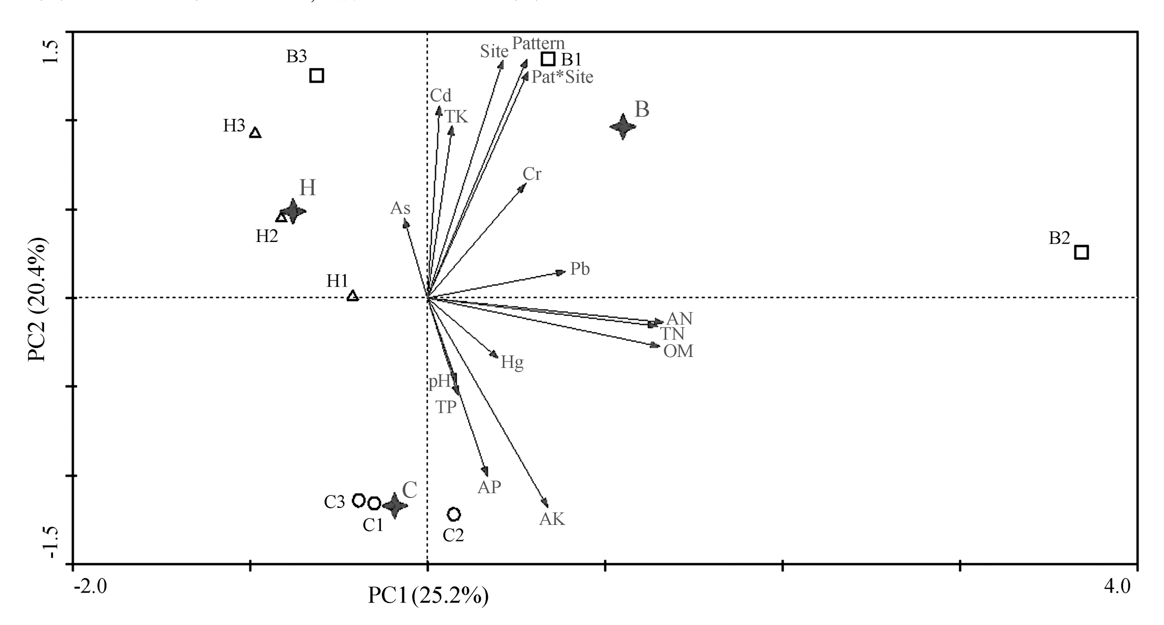


图2　土壤细菌物种分布与环境因子的 CCA 排序图

Fig. 2　CCA ordination map of the soil bacterial species distribution and environment factors

由样地分布特点可见，芒草丛模式与其他两种林地模式间关系较远，位于第一排序轴下方，两种林地模式间关系较近，均位于第一排序轴上方，说明芒草丛模式土壤细菌群落物种组成与两种以旱冬瓜为伴生树种的林地模式之间具有更大的差异性。

3 讨论

环境污染作为人类面临的共同问题，得到了越来越广泛的关注，矿业开采作为环境污染产生的根源之一，其生态恢复研究成为热点。本研究以云南省昆阳磷矿三种植被恢复模式为例，从不同植被恢复模式对土壤理化性质和细菌群落的影响以及土壤细菌群落差异的原因两个方面进行了分析，为磷矿区生态恢复工作提供理论依据和科学指导。

（1）不同植被恢复模式对土壤理化性质和细菌群落的影响

磷矿区土壤中磷和钾养分丰富，有机质和氮养分缺乏，三种模式与未恢复土壤相比，全氮、碱解氮、速效钾含量均提高，特别是碱解氮含量提高了一倍，养分流失量减少，在一定程度上提高了土壤质量。但三种模式下土壤理化指标的改变方向以及幅度并不相同，最终导致三者土壤理化性质存在较大差异。以上研究结果与和丽萍等（2012）对昆阳磷矿植被恢复土壤肥力研究的结果一致。赵敏慧等（2006a,b）对抚仙湖流域磷矿开采区不同植被恢复模式对土壤氮素和磷素流失的作用进行的研究表明，植被恢复能够抑制氮素和磷素流失但不同模式的作用效果存在差异，这是导致不同模式下土壤理化性质出现差异的重要原因之一。另一方面，不同植物对养分的吸收能力及凋落物质量和数量的差异也是导致土壤理化性质差异的重要原因。

除土壤理化性质外，不同植被恢复模式下土壤细菌群落多样性和物种组成也存在差异，土壤细菌多样性芒草丛>旱冬瓜藏柏麻栎混交林>藏柏旱冬瓜混交林，土壤细菌群落物种组成的相似性低于50%。夏北成等（1998）对多草模式和白杨树模式土壤微生物多样性进行研究时也发现，多草模式更利于土壤微生物群落多样性增加；Kowalchuk等（2002）运用PCR-DGGE方法研究发现不同植物群落下土壤细菌群落结构出现较大差异；陈来红等（2012）同样运用PCR-DGGE技术对准格尔露天矿区不同复垦时间和复垦模式下土壤细菌多样性进行研究，结果表明牧草种植模式土壤细菌多样性高于乔灌草模式，而且种植时间较短时两者的差异要高于种植时间较长时，这一研究结果与本研究结果具有相似性，本研究中三种恢复模式均处于恢复初期，其土壤细菌多样性更能表现出差异。

（2）不同植被恢复模式下土壤细菌群落差异的原因探讨

不同植被恢复模式下土壤理化性质和细菌群落均出现差异，那么，土壤细菌群落差异是由植被恢复模式不同还是不同模式导致的土壤理化性质差异引起的呢？本研究结合PCR-DGGE结果以及相关性和CCA分析对这一问题进行了探究。结果表明，植被恢复模式既能够显著影响土壤细菌多样性又极显著影响土壤细菌群落物种组成，但对土壤细菌群落物种组成影响最大的不是植被恢复模式，而是土壤碱解氮含量。

各细菌种类具有各自的原料利用生态位（Reynolds等，2003），而不同植物由于根系分泌物（地下输入）及凋落物（地上输入）的成分和含量不同提供了不同的生态位（Dakora和Phillips，2002；陈法霖等，2011），因此不同植物种类和数量会对土壤细菌种类和数量产生影响。不同植被恢复模式下植物种类和数量存在差异，因而土壤细菌种类和数量产生差异，最终导致土壤细菌群落多样性和物种组成差异。此外，大多数植物能够与菌根真菌建立共生关系，菌根真菌又与根围细菌之间具有相互作用，因此不同植物根系共生菌根真菌的种类对土壤细菌群落也会产生影响（戴梅等，2008）。研究还表明，有些具有特殊功能的植物其土壤微生物群落具有一定的特异性，例如豆科植物（Han等，2007），同样，旱冬瓜作为一种固氮植物，对土壤细菌群落可能具有一定的影响。

本研究中，土壤细菌群落物种组成与土壤碱解氮含量的相关性达到极显著水平，一方面，因为磷矿区这一特殊环境下土壤中氮养分缺乏，而氮元素是土壤微生物生长的必需元素，不同氮素利用能力的土壤细菌种类在土壤碱解氮含量变化的过程中也发生了变化。我们推测，在磷矿区恢

复初期，与氮养分转化相关的细菌在土壤细菌群落中较为活跃，首先出现变化。另一方面，本研究有两种模式中含有旱冬瓜这种固氮植物，由CCA分析结果可知这两种模式与芒草丛模式间具有更大差异，可能是因为旱冬瓜固氮作用导致的土壤中碱解氮含量的差异促进或抑制土壤细菌群落中一些特殊的固氮相关的细菌（孙瑞莲等，2004），因而不同土壤碱解氮含量下土壤细菌群落物种组成出现差异。另外，由于细菌多样性指数是基于相对多度计算出来的，当物种组成发生变化时，多样性有可能无明显变化，因此本研究中土壤碱解氮含量虽然极显著影响土壤细菌物种组成但对多样性无显著影响。

主要种群在整个生态过程中具有至关重要的作用，对其进行研究进而找出对生态系统影响最大的功能类群比对群落中所有种群进行研究更有意义。PCR-DGGE技术一般能够检测出种群数量超过1%的细菌种类（周琳等，2006），能够较好地满足对主要微生物类群的相关研究。本研究运用PCR-DGGE技术对昆阳磷矿三种不同植被恢复模式下土壤细菌群落中主要种群的多样性以及组成进行了分析，结果表明磷矿区土壤细菌群落的主要影响因素包括植被恢复模式和土壤碱解氮含量。由此可见，在进行磷矿区恢复时植被的选择非常关键，能够影响到地下微生物进而影响到微生物参与的生态过程，特别是针对磷矿区土壤有机质和氮养分含量缺乏的现状，相关功能植物的筛选尤为重要。另外，土壤中参与氮养分循环的细菌在恢复初期可能具有更加重要的作用，而且磷矿区土壤中氮养分缺乏。因此，在进一步的研究中应结合DNA测序技术对土壤中氮养分转化相关的细菌进行深入研究，将会为改善磷矿区土壤氮养分提供更加重要的科学依据。

致谢　本研究采样过程中得到云南省昆阳磷矿安全环保科人员的大力协助，PCR-DGGE实验及数据处理得到中国科学院昆明植物研究所西南野生种质资源库分子生物学实验中心、西南林业大学林学院以及熊智老师、桂恒、孙浩、刘绍雄、石玲玲的支持和帮助。

［参　考　文　献］

李贵祥，方向京，邵金平等，2012. 昆阳磷矿山损毁林地生态植被恢复技术研究［J］. 园林绿化，(3)：47—50

林先贵，2010. 土壤微生物研究原理与方法［M］. 北京：高等教育出版社，359—361

于召伟，丁德邦，高遂成，2008. 云南安宁磷矿矿山土地复垦与开发［J］. 化工矿物与加工，**6**：25—33

Asensio V，Covelo EF，Kandeler E，2013. Soil management of copper mine tailing soils—Sludge amendment and tree vegetation could improve biological soil quality［J］. *Science of the Total Environment*，**456**：82—90

Bais HP，Park SW，Weir TL *et al*.，2004. How plants communicate using the underground information superhighway［J］. *Trends in Plant Science*，**9**（1）：26—32

Becker JM，Parken T，Nakatsu CH *et al*.，2006. Bacterial activity，community structure，and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil［J］. *Microbial Ecology*，**51**（2）：220—231

Carney KM，Matson PA，2005. Plant communities，soil microorganisms，and soil carbon cycling：Does altering the world belowground matter to ecosystem functioning?［J］. *Ecosystems*，**8**：928—940

Chen FL（陈法霖），Zhang K（张凯），Zheng H（郑华）*et al*.，2011. Analyzing the effect of biology decomposition of conifer and broad of litters on soil microbial communities by using PCR-DGGE［J］. *Chinese Journal of Applied and Environment Biology*（应用与环境生物学报），**17**（2）：45—50

Chen LH（陈来红），Qiao GH（乔光华），Dong HL（董红丽）*et al*.，2012. Influence of soil bacterial diversity in the process of reclamation in Jungar open coal mine of Inner Mongolia［J］. *Journal of Arid Land Resources and Environment*（干旱区资源与环境），**26**（2）：119—125

Dai M（戴梅），Wang HX（王洪娴），Yin YY（殷元元）*et al*.，2008. Effects and mechanisms of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria［J］. *Acta Ecologic Sinica*（生态学报），**28**（6）：2854—2860

Dakora FD，Phillips DA，2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments［J］. *Plant and Soil*，**245**：35—47

Han XM，Wang RQ，Liu J *et al*.，2007. Effects of vegetation type on soil microbial community structure and catabolic diversity assessed by polyphasic methods in North China［J］. *Journal of Environmental Sciences-China*，**19**：1228—1234

Harris JA，2003. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration［J］. *European Journal of Soil Science*，**54**（4）：801—808

He LP（和丽萍），Wang YJ（王玉杰），Fang XJ（方向京）*et al*.，2012. Analysis and comprehensive evaluation of soil fertility status for vegetation restoration area of Kunyang phosphorite mine［J］. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*（长江流域资源与环境），**21**（12）：1492—1498

Jangid K，Williams MA，Franzluebbers AJ *et al*.，2008. Relative impacts of land-use，management intensity and fertilization upon soil

microbial community structure in agricultural systems [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, **40** (11): 2843—2853

Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ *et al.*, 2010. Development of soil microbial communities during tallgrass prairie restoration [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**: 302—312

Kowalchuk GA, Buma DS, de Boer W *et al.*, 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **81** (1-4): 509—520

Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA *et al.*, 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 2407—2415

Meng GT (孟广涛), Fang XJ (方向京), Chai Y (柴勇) *et al.*, 2011. Effect of vegetation restoration measures on soil nutrients and species diversity in abandoned area of Jinning phosphorite mine [J]. *Journal of Northwest Forestry University* (西北林学院学报), **26** (3): 12—16

Muyzer G, Waal ECD, Uitierlinden AG, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chainreaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environment Microbiology*, **59** (3): 695—700

Reynolds HL, Packer A, Bever JD *et al.*, 2003. Grassroots ecology: Plant-microbe-soil interactions as drivers of plant community structure and dynamics [J]. *Ecology*, **84** (9): 2281—2291

Rodriguez H, Fraga R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion [J]. *Biotechnology Advances*, **17** (4-5): 319—339

Shen AL (沈阿林), Li XY (李学垣), Wu SR (吴受容), 1997. The composition characteristics of low-molecular-weight organic acids in soil and their roles on soil material cycling [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥料学报), **3** (4): 363—371

Sun RL (孙瑞莲), Zhu LS (朱鲁生), Zhao BQ (赵秉强) *et al.*, 2004. Effects of long-term fertilization on soil microorganism and its role in adjusting and controlling soil fertility [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **15** (10): 1907—1910

Teng Y (滕应), Huang CY (黄昌勇), Luo YM (骆永明) *et al.*, 2004. Microbial activities and functional diversity of community in soils polluted with Pb-Zn-Ag mine tailings [J]. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), **41** (1): 113—119

Wang J (王江), Zhang CB (张崇邦), 2009. Soil microbial properties in the revegetation process of the barren land contaminated with heavy metals [J]. *Acta Ecologic Sinica* (生态学报), **29** (3): 1636—1646

Wu JP (吴金平), Gu YC (顾玉成), 2009. The application of ecology in soil rehabilitation for *Arbuscular mycorrhiza* fungi [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), **25** (07): 243—245

Wu YT, Gutknecht J, Nadrowski K *et al.*, 2012. Relationships between soil microorganisms, plant communities, and soil characteristics in Chinese subtropical forests [J]. *Ecosystems*, **15**: 624—636

Xia BC (夏北成), Zhou JZ, Tiedje JM, 1998. Effect of vegetation on structure of soil microbial community [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **9** (3): 296—300

Yao RJ (姚荣江), Yang JS (杨劲松), Chen XB (陈小兵) *et al.*, 2009. Classification and fuzzy synthetic evaluation of soil nutrient at plough horizon in coastal region of north Jiangsu province [J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China* (中国土壤与肥料), **2009** (4): 16—20

Zhang PJ (张平究), Pan GX (潘根兴), 2010. Changes of soil microbial communities and activities along a vegetation succession in karst soil: A case study of Stone Forest, Yunnan, China [J]. *Geographical Research* (地理研究), **29** (2): 223—234

Zhao J, Wu XB, Nie CP *et al.*, 2012. Analysis of unculturable bacterial communities in tea orchard soils based on nested PCR-DGGE [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **28** (5): 1967—1979

Zhao MH (赵敏慧), Yang SH (杨树华), Wang BR (王宝荣), 2006a. A study on soil phosphorus runoff of different vegetation types in phosphorus mineral region of Fuxian lake watershed [J]. *Journal of West China Forestry Science* (西部林业科学), **35** (4): 45—50

Zhao MH (赵敏慧), Yang SH (杨树华), Wang BR (王宝荣), 2006b. Study of different vegetation to soil TN loss volume control with rainfall runoff-An case study as phosphorus ore mining areas of Fuxian lake watershed [J]. *Yunnan Geographic Environment Research* (云南地理环境研究), **18** (4): 20—26

Zheng HY (郑贺云), Li ZK (黎志坤), Li C (李超) *et al.*, 2012. Analysis of the bacterial diversity and dominant population in Akesu Saline-alkali in Xinjiang [J]. *Microbiology China* (微生物学通报), **39** (7): 1031—1043

Zhou L (周琳), Zhang XJ (张晓君), Li GX (李国勋), 2006. The application of DGGE/TGGE techniques in molecular microbial ecology of soil [J]. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), (5): 67—71